



Kit de ihcDirect® citoqueratina 8/18 Anti-citoqueratina humana 8/18 (clon C94)

K41001-010 100 tinciones de tejido*
K41001-005 50 tinciones de tejido*

Uso previsto: para diagnóstico in vitro

El anticuerpo anti-citoqueratina 8/18 (CK 8/18) humano, marcado con peroxidasa polimerizada de rábano picante (pHRP) (Citoqueratina 8/18 pHRP) está indicado para su uso en el laboratorio, para la identificación cualitativa, mediante microscopía óptica, de la presencia de CK 8/18 en cortes de tejido fijados en formol e incluidos en parafina, o tejidos congelados, con el uso de métodos inmunohistoquímicos (IHQ). La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar mediante estudios morfológicos con el uso de testigos adecuados, y se debe evaluar dentro del contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas por un anatomopatólogo o médico cualificado. Este conjugado se ha diluido previamente y se ha optimizado para el uso en inmunohistoquímica sin diluciones posteriores.

Resumen y explicación:

El anticuerpo anti-citoqueratina 8/18 reconoce las proteínas filamentosas, de bajo peso molecular, intermedias, de citoqueratina humana, de 52,5 kD y 45 kD, es decir, las citoqueratinas 8 y 18, respectivamente. Las citoqueratinas 8 y 18 se expresan en la mayoría de los epitelios simples y glandulares, como la tiroides, mama femenina, tubo gastrointestinal y vías respiratorias. En los tejidos con cáncer, los adenocarcinomas expresan estas proteínas; sin embargo, los carcinomas de células pavimentosas queratinizantes no las expresan. Los anticuerpos frente a CK8 y CK18 se pueden utilizar en la clasificación de tumores de origen epitelial (Cimpean y cols., 2008; Reisenblichler 2013). El componente principal de este kit es anticuerpo de ratón anti-citoqueratina 8/18 humano, marcado con polímero (PoliHRP) de peroxidasa de rábano picante (HRP) (clon C94). El bloqueante ihq que se entrega con el kit, usado antes de la aplicación del conjugado CK 8/18 pHRP, disminuirá la tinción de fondo y la tinción inespecífica. En este kit se usa el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB).

Principio del procedimiento:

El conjugado de anticuerpo ihcDirect anti-citoqueratina 8/18 pHRP, listo para usar, se aplica directamente en cortes de tejido sometidos a tratamiento previo, donde se une a la citoqueratina 8/18 humana. A continuación, se aplica una solución de trabajo de DAB al tejido. La pHRP ligada al anticuerpo anti-citoqueratina 8/18 cataliza la DAB para formar un producto visible, de color marrón, que se precipita en el sitio de la citoqueratina 8/18 humana. A continuación, la muestra se puede someter a una contratinción con hematoxilina y se aplica un cubreobjetos. Los resultados se visualizan e interpretan con ayuda de un microscopio óptico. Los volúmenes se basan en 100 µl de anticuerpo por tejido. Este kit inmunohistoquímico se puede llevar a cabo de manera manual o en un sistema abierto y automático de tinción inmunohistoquímica.

Reactivos suministrados:

Ref. del kit	Σ	Descripción
K41001-005*	50*	Conjugado de anticuerpo ihcDirect Ck 8/18, listo para usar, de 5 ml de tamaño, bloqueante ihq y volumen equivalente de DAB ihq y diluyente de DAB ihq.
K41001-010*	100*	Conjugado de anticuerpo ihcDirect Ck 8/18, listo para usar, de 10 ml de tamaño, bloqueante ihq y volumen equivalente de DAB ihq y diluyente de DAB ihq.

* Un volumen estimado de 100 µl de conjugado de anticuerpo por tejido.

Inmunógeno	Clon	Especie	Clase de Ig	Conc. total de proteínas
Citoqueratina 8/18 humana	C94	Ratón	IgG	10 mg/ml

El anticuerpo anti-CK 8/18 es un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido a la citoqueratina 8/18 humana purificado a partir de ascitis. La HRP se extrae de la planta del rábano picante. El bloqueante ihc contiene suero normal de cabra y albúmina de suero bovino al 1 %, en un sistema patentado de solución amortiguadora, con tiomersal al 0,01 % como conservante.

El diluyente de la DAB ihq contiene el sustrato de peróxido amortiguado. La DAB ihq (cromógeno) contiene 3,3' diaminobencidina, que está disuelta en un sistema patentado de solución amortiguadora, sin productos químicos peligrosos, a una concentración notificable. Este reactivo es fotosensible. Para unos resultados

óptimos, se debe reducir al mínimo el tiempo de apertura del frasco. Manténgase lejos de la luz.

Componentes del kit de citoqueratina 8/18 pHRP correspondientes a los kits de prueba de 5 ml y 10 ml:

Componentes del kit	Números de referencia de los componentes	Tamaños
CK8/18 pHRP	H31001-(R###) (005, 010)	5 ml, 10 ml
ihc Blocker	C30005-(###ML) (005, 010)	5 ml, 10 ml
ihc DAB Diluent	C30004-(###ML) (007, 013)	7 ml, 13 ml
ihc DAB	C30003-(###UL) (200, 375)	200 µl, 375 µl

Materiales necesarios pero no suministrados:

Se pueden necesitar los siguientes reactivos o suministros para la tinción, pero no se suministran:

- Fijador de cortes de tejido congelados (fijador ihq) o acetona de calidad para reactivo
- Tejidos de testigos positivo y negativo
- Láminas portaobjetos para microscopios, con carga positiva (**necesario**)
- Frascos de tinción, baños o instrumentos de procesamiento
- Solución amortiguadora de lavado ihq (PBS-T)
- Pipeta y puntas de pipeta
- Temporizador
- Solución amortiguadora de recuperación de antígeno (si se usan tejidos fijados en formol e incluidos en parafina)
- Bloqueante de peróxido (opcional)
- Instrumentos utilizados para el tratamiento previo de los tejidos, por ejemplo, baño de María, olla de presión u horno de microondas (si se usan tejidos fijados en formol e incluidos en parafina)
- Hematoxilina
- Xileno o sustituto de xileno
- Etanol
- Medio de montaje
- Cubreobjetos
- Microscopio óptico (40 - 400x)

Formulaciones de reactivo a granel Novodiox:

- Fijador ihq (375 ml de alcohol metílico, 100 ml de formaldehído al 37 % y 25 ml de ácido acético glacial).
- Solución amortiguadora de lavado ihq (PBS-T) (solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %).
- Solución amortiguadora de recuperación de antígeno ihq (solución amortiguadora cítrica 10 mM, pH 6,0, Tween 20 al 0,02 %).

Conservación y manipulación:

El kit se debe conservar a 2 - 8 °C. No congelar. La solución de trabajo de DAB se debe elaborar antes de su uso y se mantiene estable a una temperatura entre 2 y 8 °C durante el día en que se elaboran los reactivos. Este kit es adecuado para su uso hasta la fecha de caducidad, si se conserva a una temperatura entre 2 y 8 °C. No utilice el producto después de la fecha de caducidad indicada en el frasco, a menos que Novodiox indique una información de ampliación de la fecha. Si los reactivos se conservan en condiciones distintas a las especificadas en el prospecto, el usuario debe comprobarlas.

Preparación de la muestra:

Cortes incluidos en parafina: los tejidos procesados de manera sistemática, en una solución amortiguadora neutra al 10 % y fijados en formol son adecuados para su uso antes de la inclusión en parafina. Consulte la bibliografía (Kiernan, 1981; Sheehan y Hrapchak, 1980). Pueden producirse resultados variables a consecuencia de la fijación prolongada. Se debe efectuar cada corte al grosor adecuado (aproximadamente 4 a 5 µm) y se debe colocar en un portaobjetos de vidrio, con carga positiva. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido se deben cocer durante un tiempo mínimo de una hora, pero no más de 24 horas, en un horno a entre 58 y 60 °C ± 5 °C. Antes del procesamiento de los tejidos, se deben descalcificar los tejidos óseos para facilitar el corte del tejido y evitar que las cuchillas del micrótopo se dañen (Kiernan, 1981; Sheehan y Hrapchak, 1980).

Cortes congelados de tejido: el tejido congelado se debe cortar al grosor adecuado (aproximadamente 5 µm) y colocar en un portaobjetos de vidrio, con carga positiva. Se deben fijar los tejidos en fijador ihq Novodiox en acetona de calidad para reactivo, durante 30 segundos a un minuto, inmediatamente después de hacer el corte. La acetona de calidad para reactivo se debe mantener fría, p. ej., a una temperatura de criostato o a temperatura ambiente. Después de la fijación, el tejido se puede conservar en PBS-T hasta un tiempo máximo de un día.



Tratamiento de los tejidos antes de la tinción: el tratamiento previo depende del tejido y debe efectuarse según lo sugerido en los apartados del procedimiento de tinción.

Advertencias y precauciones:

- El conjugado de anticuerpo CK8/18 pHRP está prediluido. Una dilución posterior puede disminuir la intensidad de la señal o puede producir una tinción falsamente negativa. Estas recomendaciones sirven solo como guía. Los encargados de laboratorio deben decidir sus propios procedimientos y normas de calidad.
- Al manipular reactivos, tome las precauciones razonables. Al manipular carcinógenos sospechosos o materiales tóxicos, use equipo de protección, por ejemplo, guantes desechables y bata de laboratorio. Lea las fichas de datos de seguridad (FDS) antes de usar el producto.
 - Se usa tiomersal como conservante en esta solución y la sustancia está clasificada como tóxica. La inhalación produce efectos respiratorios y en el SNC, y neurotoxicidad retardada intensa.
 - ¡ADVERTENCIA! El producto DAB contiene 3,3'diaminobencidina, que puede producir efectos genéticos o cáncer. Si está expuesto o preocupado, busque atención médica. Para más información, consulte la FDS de la DAB.
- Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con una zona sensible, lávela con una cantidad abundante de agua.
- Para asegurar la adherencia al tejido, use portaobjetos cargados.
- Las muestras de los pacientes y todos los materiales que entran en contacto con las muestras de los pacientes se deben manipular como materiales biopeligrosos y se deben eliminar correctamente.
- Consulte a las autoridades locales o regionales en cuanto a los métodos recomendados de eliminación de materiales biopeligrosos y de materiales peligrosos de desechos químicos.
- Un tiempo y una temperatura de incubación distintos a los especificados pueden dar resultados erróneos. El usuario debe validar los cambios de ese tipo.
- Al preparar fijadores y soluciones amortiguadoras, utilice productos químicos de calidad para laboratorio, por ejemplo, acetona, etanol y agua. El usuario debe validar el rendimiento, incluida la estabilidad correspondiente a los reactivos preparados en el laboratorio (a 1X).
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos.

Procedimientos de tinción:

Notas operativas generales:

- Equilibre todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Antes de usar la solución de anticuerpo marcado con pHRP, dele vueltas o agítela. **No la mezcle en vórtex.** Calcule la cantidad de solución de trabajo de DAB necesaria (100 µl por tejido) y prepare solución de trabajo de DAB fresca, añadiendo la proporción de 30 µl de DAB ihq a 1,0 ml de diluyente de DAB ihq en un tubo de microcentrifugadora.
- Lo mejor es evitar que los portaobjetos se sequen durante el proceso de tinción, a fin de evitar una tinción de fondo no deseada.
- Lave con cuidado y a conciencia los tejidos durante los pasos de lavado manual. Evite las corrientes de lavado de alta velocidad que pudieran tender a dañar o cortar tejidos delicados.
- Después de cada paso manual del ensayo, elimine con papel de seda el exceso de líquido en los portaobjetos con tejido. El exceso de solución residual puede diluir reactivos posteriores, produciendo una tinción negativa o no uniforme.
- En el caso de los tejidos con un grado elevado de actividad de oxidasa, p. ej., los tejidos gastrointestinales o renales, se requiere un paso bloqueante adicional con H₂O₂ para reducir al mínimo el fondo.
- Se ha validado el siguiente protocolo a temperaturas comprendidas entre 21 y 30 °C para la incubación de bloqueante ihq, CK 8/18 pHRP y solución de trabajo de DAB. Si la temperatura ambiental es inferior a 21 °C, incube el anticuerpo marcado durante un tiempo más prolongado (≥ 4 minutos, en función de la temperatura). Se han obtenido resultados congruentes con el uso de un calienta-portaobjetos graduado a 30 °C.

Cortes de tejido congelados:

- Coloque los cortes de tejido congelados en solución fijadora inmediatamente después de efectuar el corte. **La exposición prolongada a temperaturas ambiente o de congelación puede alterar los epítomos destinatarios.**

- El paso de incubación de la solución de trabajo de DAB está dentro de los límites de 1 y 3 minutos. El usuario debe determinar el tiempo óptimo de incubación correspondiente a su entorno de laboratorio y debe observar la formación de color marrón, mediante la inspección visual durante la incubación.

Est. de los tiempos de prueba (protocolo IHQ de 10 minutos para cortes de tejido congelados):

Procedimiento congelados	Tiempo en minutos
Fijación, usar acetona o fijador ihq	0:30 - 1:00
- Lavar con ihc Wash	0:15
Bloquear con ihc Blocker	1
- Dar un golpe ligero y transferir para eliminar el exceso de bloqueador.	- - -
CK 8/18 pHRP	3
ihc Wash	0:15
- Dar un golpe ligero y transferir para eliminar el exceso de sol. amortiguadora de lavado.	- - -
Solución de trabajo de DAB	1 - 3
ihc Wash	0:15
Contratinción de hematoxilina	0:20
ihc Wash	0:15
Deshidratar/montar el medio y cubreobjetos	0:45
Total	10

Tejidos en parafina:

- Desparafinización: empape los portaobjetos en xileno, 3 veces durante 5 minutos cada uno. A continuación, 3 minutos en etanol al 100 %, 3 minutos al 95 % y 3 minutos al 75 %. Luego, lave los portaobjetos con agua de grifo en un depósito de portaobjetos, dos veces, 2 minutos cada vez.
- Recuperación del antígeno: en un baño de María, incube los portaobjetos en solución amortiguadora de recuperación de antígeno, en un depósito de portaobjetos, a 96 °C, durante 30 minutos; luego, enfríe los portaobjetos a temperatura ambiente durante 30 minutos. Enjuague dos veces los portaobjetos con agua de grifo, 2 minutos cada vez.
- (Opcional) Bloquee el tejido con H₂O₂: empape los portaobjetos en H₂O₂ al 3 % en un depósito de portaobjetos; deje en reposo durante 10 minutos. Enjuague dos veces los portaobjetos con agua de grifo y, luego, lávelos una vez con PBS-T en el depósito de portaobjetos, durante 2 minutos.
- Dispense 100 µl de bloqueador ihq que cubra todo el tejido, e incube a temperatura ambiente durante 15 minutos. Retire la mayor cantidad de bloqueador ihq que sea posible pero no enjuague los portaobjetos con PBS-T o agua.
- Dispense 100 µl de anticuerpo anti-CK 8/18 humano, marcado con pHRP, en portaobjetos que cubran todo el tejido, e incube durante 15 a 30 minutos, a temperatura ambiente. Enjuague tres veces los portaobjetos con PBS-T en el depósito de portaobjetos, 2 minutos cada vez. Nota: Si se usan tiempos de incubación más prolongados, coloque los portaobjetos en una cámara húmeda para evitar la evaporación.
- Dispense 100 µl de solución de trabajo de DAB que cubra todo el tejido, e incube durante 3 a 10 minutos, a temperatura ambiente. Enjuague dos veces los portaobjetos con agua de grifo en el depósito de portaobjetos, 2 minutos cada vez.
- Contratinción: añada hematoxilina e incube durante 1 minuto a temperatura ambiente. Enjuague dos veces con agua de grifo, 2 minutos cada vez.
- Deshidratación: Empape los portaobjetos en el siguiente orden: etanol al 75 % durante 3 minutos, etanol al 95 % durante 3 minutos, etanol al 100 % durante 3 minutos y xileno, dos veces, 5 minutos cada vez.
- Aplicación de cubreobjetos: añada una gota de medio de montaje permanente en el portaobjetos y el cubreobjetos; luego, aplique el cubreobjetos.

Procedimientos de control de calidad:

Se deben ejecutar simultáneamente testigos positivo y negativo con las muestras de los pacientes.



Testigo de tejido positivo: los tejidos recomendados de testigo positivo para este anticuerpo son tejidos procesados correctamente de carcinoma de mama y adenocarcinoma de pulmón. La tinción es citoplasmática. En cada ejecución de tinción se debe incluir un testigo de tejido positivo por cada grupo de condiciones de la prueba.

Se deben seleccionar los tejidos usados para el testigo positivo a partir de muestras de los pacientes con valores bajos y bien caracterizados de la actividad destinataria positiva que da una tinción positiva débil. Los testigos conocidos de tejido positivo se deben usar únicamente para la vigilancia del funcionamiento correcto de tejidos procesados y reactivos de la prueba, y no como ayuda para la formulación de un diagnóstico específico de muestras de los pacientes. Si los testigos de tejido positivo no demuestran una tinción positiva, los resultados con las muestras del paciente se deberán considerar no válidos.

Testigo de tejido negativo: se puede usar el mismo tejido usado para el testigo positivo como testigo de tejido negativo. La variedad de tipos celulares en la mayoría de los cortes de tejido ofrece lugares internos de testigo negativo. Sin embargo, el usuario debe comprobar este hecho. Los componentes que no tiñen deben demostrar la ausencia de una tinción específica y proporcionar una indicación de tinción inespecífica de fondo. Si se produce una tinción específica en los sitios de testigo de tejido negativo, los resultados con las muestras del paciente se deben considerar no válidos.

Solución de problemas:

Si se produce una pauta inesperada de tinción en los tejidos testigos o en las muestras del paciente, se debe tener en cuenta lo siguiente:

1. Ausencia de tinción: si no hay tinción en el portaobjetos de testigo positivo, compruebe si: 1) el cromógeno se preparó fresco y correctamente; 2) se usaron los reactivos en el orden indicado; 3) se añadió, efectivamente, el anticuerpo marcado con pHRP, y 4) en el caso del tejido fijado en formol e incluido en parafina, el descerado y la recuperación del antígeno se hicieron de manera insuficiente. Efectúe cualquier medida correctiva necesaria y repita el procedimiento.
2. Tinción débil: compruebe si 1) los reactivos están caducados; 2) la temperatura ambiente era inferior a 21 °C si no se usó un calienta-portaobjetos a 30 °C; 3) se preparó el cromógeno fresco; 4) había una cantidad excesiva de solución de lavado restante en el portaobjetos y diluyó el siguiente reactivo, y 5) en el caso del tejido fijado en formol e incluido en parafina, el descerado y la recuperación del antígeno se hicieron de manera insuficiente. Efectúe cualquier medida correctiva necesaria y repita el procedimiento.
3. Fondo alto: las causas posibles pueden ser 1) lavados insuficientes; 2) no se aplicó bloqueador o se lavó después de la aplicación; 3) las muestras se secaron; 4) incubación prolongada con cromógeno; 5) incubación prolongada con anticuerpo marcado con pHRP, y 6) las muestras contienen una cantidad alta de peroxidasa endógena y necesitan un paso adicional de bloqueo (consulte el paso de bloqueo del tejido con H₂O₂ en "Procedimientos de tinción con tejidos de parafina"). Efectúe cualquier medida correctiva necesaria y repita el procedimiento.
4. Los volúmenes del cromógeno de DAB ihq proporcionados en el kit coinciden con el tamaño del kit para un usuario habitual. En ocasiones, los materiales se pueden pegar a la tapa o los lados del frasco. Para tener acceso a todo el material, puede ser necesario centrifugar a velocidad baja o dar unos golpes suaves en la parte inferior del frasco, con cuidado, antes de usar el producto.

Si se observa una pauta inesperada de tinción en los tejidos testigo o en las muestras de los pacientes, lo cual no se puede explicar por las variaciones en los procedimientos de laboratorio, o si se sospecha algún problema con el anticuerpo, póngase inmediatamente en contacto con Asistencia Técnica de NovodiAx o con su distribuidor local. En EE. UU. y Canadá, llame al +1 (888) 439-2716, ext. 2 o al +1 (510) 342-3043, ext. 2.

Resultados esperados:

Se obtienen tinciones de color marrón intenso con un fondo limpio si existen células de expresión de citoqueratina 8/18. No se obtienen tinciones de color marrón si no existen células de expresión de citoqueratina 8/18. La interpretación del resultado de la tinción es únicamente responsabilidad del usuario.

Limitaciones generales:

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varios pasos, que requiere una capacitación especializada en la selección de los reactivos correctos; la selección, fijación y procesamiento del tejido; la preparación del portaobjetos inmunohistoquímico, y la interpretación de los resultados de la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o corte incorrectos o contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir errores, atrapamiento de anticuerpos o resultados falsamente negativos. Los resultados incongruentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, o a irregularidades inherentes dentro del tejido (Nadji M, Morales AR. 1983).

El fabricante suministra estos anticuerpos y reactivos a una dilución óptima para su uso según las instrucciones proporcionadas para la inmunohistoquímica en cortes preparados de tejido. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados de la prueba puede invalidar los resultados esperados declarados; se debe emplear y dejar constancia de testigos adecuados. Los usuarios que incumplan los procedimientos recomendados de las pruebas deben aceptar la responsabilidad en cuanto a la interpretación de los resultados de los pacientes en estas circunstancias.

Características del rendimiento:

Se ha determinado el rendimiento del kit de prueba ihcDirect CK 8/18 pHRP con el uso de cortes de tejido congelados, y fijados en formol e incluidos en parafina. NovodiAx ha llevado a cabo estudios para evaluar el rendimiento de los conjugados de anticuerpos, los reactivos del kit acompañante y los suministros auxiliares. Se ha observado que los anticuerpos y los sistemas son sensibles y muestran una fijación específica al antígeno de interés, con una fijación mínima o sin fijación de los tejidos o células inespecíficos. Los anticuerpos NovodiAx y los reactivos del kit acompañante han demostrado unos resultados reproducibles y uniformes cuando se usan en una sola ejecución, entre ejecuciones y entre lotes. Se ha establecido que estos productos son estables durante los períodos especificados en las fichas técnicas, mediante métodos estándar, en tiempo real o en tiempo acelerado. NovodiAx garantiza la calidad del producto mediante el examen de cada lote de material y mediante el examen de los materiales a intervalos regulares, y mediante programas de vigilancia.

Clave de los símbolos de ihcDirect Citoqueratina 8/18		
	Producto sanitario de diagnóstico <i>in vitro</i>	Conjugado de anticuerpo pHRP CK 8/18
	Número de catálogo	Reactivo bloqueante
	Fecha de caducidad: AAAA-MM-DD	Reactivo cromógeno de DAB
	Consulte las instrucciones de uso	Reactivo diluyente de DAB
	Código de lote	Sol. amortiguadora de lavado
	Contiene cantidad suficiente para < n > pruebas	Peligro para la salud
	Limitación de temperatura	Fabricante
	Representante Autorizado en la Unión Europea	Marca CE

Acceso a las instrucciones de uso (IU):

Para consultar la traducción u obtener la versión electrónica más reciente de unas IU, visite nuestro sitio web a través de <https://www.novodiox.com/support/literature/> (ihcDirect IFU). Si desea obtener una copia impresa de unas IU, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de NovodiAx o con el distribuidor de su zona.

Bibliografía:

1. Cimpean AM et al. Relevance of the immunohistochemical expression of cytokeratin 8/18 for the diagnosis and classification of breast cancer. Romanian Journal of Morphology and Embryology. 2008; 49(4):479-483.
2. Reisenblichler ES et al. The predicative ability of a CK5/p63/CK8/18 antibody cocktail in stratifying breast papillary lesions on needle biopsy. Am J Clin Pathol. 2013; 140:767-779.
3. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
4. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med, 1983; 14:767-771.

